



PATOLOGIA DE SEMENTES

Embrapa



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

presidente

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

ministro da agricultura e do abastecimento

ARLINDO PORTO NETO



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

presidente

ALBERTO DUQUE PORTUGAL

diretores

DANTE DANIEL G. SCOLARI

ELZA ANGELA BATTAGGIA BRITO DA CUNHA

JOSÉ ROBERTO RODRIGUES PERES

Centro Nacional de Pesquisa de Soja

chefe

JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO

chefe adjunto técnico

PAULO ROBERTO GALERANI

chefe adjunto de apoio

VÂNIA BEATRIZ R. CASTIGLIONI

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:

Área de Difusão de Tecnologia da Embrapa Soja

Caixa Postal 231 - CEP 86 001-970

Telefone (043) 371 6000 Fax (043) 371 6100

Londrina, PR

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa da Área de Difusão de Tecnologia da Embrapa Soja



Documentos, 90

ISSN 0100-6703

Patologia de sementes

Ademir A. Henning

Embrapa

comitê de publicações

CARLOS CAIO MACHADO

ODILON FERREIRA SARAIVA

CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO

IVAN CARLOS CORSO

NORMAN NEUMAIER

IVANIA APARECIDA LIBERATTI

MARIA CRISTINA NEVES DE OLIVEIRA

tiragem:

1.000 exemplares

1ª reimpressão:

1.500 exemplares - outubro/1997

HENNING, A.A. Patologia de sementes. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 43p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 90).

1. Semente - Patologia. I. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). II. Título. III. Série.

CDD 633.521

Apresentação

A soja é afetada, no campo, por grande número de patógenos. Fungos, bactérias e vírus, podem causar sérios prejuízos à agricultura em geral. Muitos desses patógenos utilizam a semente como meio de sobrevivência e disseminação a longas distâncias.

Na moderna indústria de sementes, o controle de qualidade deve ser exercitado em todas as fases do processo de produção, desde a seleção do campo de produção até a comercialização de um lote de sementes.

Esta publicação aborda, de maneira sucinta, os principais métodos de análise sanitária de sementes, com ênfase à cultura da soja e poderá ser um referencial não só para os produtores de sementes, mas para os órgãos governamentais orientadores da política agrícola.

A análise sanitária da semente, juntamente com outros testes fisiológicos como tetrazólio, germinação padrão e vigor, dentre outros, pode esclarecer as causas de problemas de baixa qualidade da semente, além de orientar, com maior precisão, a necessidade ou não do tratamento.

Este trabalho destina-se, em princípio, a profissionais de laboratórios de análise de sementes, envolvidos com testes de sanidade, a instituições governamentais e a Escolas de Agronomia que priorizam essa disciplina no seu *currículum*.

Paulo Roberto Galerani
Chefe Adjunto Técnico

Sumário

1. HISTÓRICO.....	7
2. IMPORTÂNCIA DA PATOLOGIA DE SEMENTES.....	8
3. TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES.....	9
3.1. REQUISITOS BÁSICOS.....	9
3.2. OBJETIVOS DOS TESTES DE SANIDADE.....	9
3.3. IMPORTÂNCIA.....	10
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS.....	10
3.4.1. Métodos sem incubação.....	11
3.4.2. Métodos com incubação.....	12
3.4.3. Métodos de sintoma em plântulas.....	14
3.4.4. Testes bioquímicos.....	15
3.4.5. Testes sorológicos.....	16
3.4.6. Microscopia eletrônica.....	19
4. FATORES DE VARIAÇÃO NOS TESTES DE INCUBAÇÃO.....	19
5. TESTE DE SANIDADE PARA SEMENTES DE SOJA.....	22
5.1. INTRODUÇÃO.....	22
5.2. PATÓGENOS IMPORTANTES NAS SEMENTES E DOENÇAS.....	25
5.2.1. <i>Phomopsis</i> spp. - Seca da haste e da vagem.....	25
5.2.2. <i>Diaphorte phaseolarum</i> f. sp. <i>meridionalis</i> (<i>Phomopsis phaseoli</i> f. sp. <i>meridionalis</i>) Morgan-Jones - Cancro da haste.....	29
5.2.3. <i>Colletotricum dematium</i> (Pers. ex. fr.) Grove var. <i>truncata</i> (Schw.) Von Arx. - Antracnose.....	29

5.2.4. <i>Cercospora kikuchii</i> . (Matsu & Tomoy) Gardner - Mancha-púrpura.....	31
5.2.5. <i>Cercospora sojina</i> Hara - Mancha "olho-de-rã".....	32
5.2.6. <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid - Podridão preta das raízes.....	33
5.2.7. <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn - Tombamento e morte em reboleira.....	33
5.2.8. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Lib (De Bary) - Podridão branca da haste.....	34
5.2.9. <i>Fusarium semitectum</i> Berk. & Rav.....	35
5.3. MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS PATÓGENOS NAS SEMENTES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	39

PATOLOGIA DE SEMENTES

Ademir A. Henning¹

1. HISTÓRICO

Apesar de relatos anteriores sobre a associação de patógenos com sementes, foi em 1755 que a Patologia de Sementes teve seu início quando Tillet, na França, provou que semente de trigo transmite a cárie (*Tilletia caries*). Posteriormente, outros estudos foram conduzidos por Prevost em 1807, Jensen em 1887, Frank em 1888 e Hiltner em 1917. Entretanto, foi somente em 1927 que o ramo da ciência denominado Patologia de Sementes passou a ser internacionalmente reconhecido, quando a ISTA (*International Seed Testing Association*) criou o comitê de Fitopatologia. Lucie Doyer (Holanda) foi a primeira coordenadora desse comitê até a sua morte, em 1949.

Nas Américas, a Patologia de Sementes tem recebido pouco reconhecimento, especialmente nos Estados Unidos onde a mesma é tida como sub-disciplina da Fitopatologia, apesar das relevantes contribuições no campo da epidemiologia e do controle de importantes patógenos transmitidos por sementes, como o vírus do mosaico da alface (LMV). Só recentemente, a Patologia de Semen-

¹ Engenheiro Agrônomo, MSc., Ph.D. - Patologista de sementes do Centro Nacional de Pesquisa de Soja da EMBRAPA. Londrina, PR.

tes passou a receber maior atenção, particularmente nos programas de controle de qualidade das indústrias de sementes.

No Brasil, a Patologia de Sementes começou a se estruturar em meados da década de 70, com a realização do Primeiro Workshop Latino-Americano de Patologia de Sementes, em Londrina, PR, em 1977. Em 1981, Wetzel et al. publicaram uma extensa bibliografia em patologia de sementes no Brasil, onde foram levantados 416 artigos relativos à essa especialidade.

Porém, foi com a criação do COPASEM (Comitê de Patologia de Sementes) da ABRATES (Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes), em 20 de março de 1984, que a Patologia de Sementes se implantou no País. Esse comitê, segundo Soave & Wetzel (1987), além de organizar simpósios e cursos de treinamento, assessorou o Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária na elaboração das normas para o credenciamento de laboratórios para análise de sementes para executar os testes de sanidade, conforme a Portaria nº 28 de 7 de março de 1988.

Com a publicação do livro "Patologia de Sementes", em 1987, pela ABRATES/COPASEM e a Fundação Cargill, implantou-se, definitivamente, o marco histórico para a Patologia de Sementes no Brasil.

2. IMPORTÂNCIA DA PATOLOGIA DE SEMENTES

Aproximadamente 90% das culturas utilizadas para alimentação são propagadas por sementes. Dentre essas, nove são consideradas de importância primordial: soja, trigo, arroz, milho, feijão, amendoim, sorgo, cevada e beterraba açucareira. Todas podem ser afetadas por patógenos devastadores transmitidos através da semente (Neergaard 1979). Assim, o teste de sanidade de semente pode ser considerado como "medicina preventiva", tanto nos pro-

gramas de quarentena quanto no sistema de produção de semente melhorada. Mas para que os testes de sanidade de sementes se tornem eficientes, devem predizer, com relativa precisão, o comportamento dos principais patógenos associados às sementes.

3. TESTES DE SANIDADE DE SEMENTES

3.1 REQUISITOS BÁSICOS

O teste de sanidade deve fornecer informações confiáveis acerca da qualidade sanitária da semente destinada à semeadura ou aos serviços de quarentena. Os resultados, além de serem reproduzíveis, devem estar disponíveis em curto espaço de tempo, mantendo, dentro de limites aceitáveis, os custos da mão de obra e dos equipamentos.

3.2 OBJETIVOS DOS TESTES DE SANIDADE

Os testes de sanidade têm como objetivo determinar a condição sanitária da amostra de sementes e, por inferência, a qualidade do lote, fornecendo informações para:

- o serviço de quarentena;
- os esquemas de certificação de sementes;
- a avaliação do valor cultural;
- a determinação da necessidade do tratamento de sementes;
- a avaliação da eficiência do tratamento de sementes;
- os testes de qualidade dos grãos armazenados (fungos de armazenagem); e
- a avaliação da resistência de cultivares.

3.3 IMPORTÂNCIA

O inóculo presente na semente poderá resultar em aumento progressivo de uma dada doença no campo, podendo reduzir o valor comercial da cultura. Além disso, semente infectadas podem introduzir patógenos importantes como *Peronospora tabacina* (mofo azul do tabaco), *Plasmopara halstedii* (míldio do girassol), *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (cancro da haste da soja), dentre outros, em áreas antes livres dessas doenças. Os dois últimos são exemplos típicos do que ocorreu no Brasil. O míldio do girassol foi introduzido, via semente, no início da década de 80 (Ferreira et al. 1983) e, em 1989, o agente causal do cancro da haste foi detectado na região de Ponta Grossa (PR). Hoje, a doença está alastrada por quase todas as regiões produtoras de soja do País e tem causado enormes prejuízos aos produtores (Yorinori 1990).

Os testes de sanidade de sementes também podem esclarecer as causas da baixa germinação, comum em amostras com elevados índices de infecção. Um exemplo típico dessa situação é fornecido pelo DIACOM (diagnóstico completo) que esclarece a baixa germinação de sementes de soja nos testes de germinação em laboratório, quando estas estão com altos índices de *Phomopsis* spp. (Henning & França Neto 1980, 1984).

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

A escolha de determinado método, entre os vários existentes, depende do tipo de patógeno envolvido, das condições disponíveis e dos propósitos do teste (Neergaard 1979). A ISTA, através do seu *Handbook on Seed Health Testing*, tem publicado metodologias para diferentes patógenos, em diversas culturas. Além disso, excelente fonte de referência em português é o livro "Patologia de Sementes" editado por Soave & Wetzel e publicado, em 1987, pela ABRATES/ COPASEM, com apoio da Fundação Cargill.

3.4.1 Métodos sem incubação

- a) Inspeção direta: as sementes são examinadas a seco para determinar impurezas (material inerte, esclerócios, galhas, insetos), sintomas típicos de determinadas doenças [mancha café (VMCS) e mancha púrpura (*Cercospora kikuchi*)], deformações e sinais de infecção tais como picnídios, crosta de oosporos, etc. A inspeção à seco pode, algumas vezes, ser efetuada sob luz ultravioleta onde alguns organismos produzem fluorescência característica. *Ascochyta pisi* causa fluorescência verde-amarelada em ervilha (*Pisum sativum*); *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* produzem fluorescência azul-esbranquiçada, em feijão branco ou de cor creme (*Phaseolus vulgaris*); e, *Septoria nodorum* produz fluorescência esverdeada, em sementes de trigo (*Triticum aestivum*).
- b) Sementes imersas em água ou lactofenol: método usado para facilitar a identificação de *Septoria nodorum*, em trigo (picnídios exudam esporos) e dos nematóides *Aphelenchoides besseyi* e *Ditlenchus angustus*, em arroz.
- c) Exame da suspensão após a lavagem das sementes: uma quantidade de semente é agitada por determinado período de tempo em uma quantidade de água que poderá conter detergente ou dispersante. A centrifugação é opcional. Os esporos são contados em hemacitômetro. O uso de espectofotômetro para a determinação dos esporos em suspensão, após a calibração, é muito mais fácil e rápido do que o do hemacitômetro. O exame, após a lavagem da semente, é um método muito usado para determinar a quantidade de esporos de carvão (*Ustilago* spp.) em cereais, porém pode ser usado para outros fungos. O método é rápido e barato, pois não necessita de equipamento especial nem de incubação. As principais limitações são: 1) só pode ser usado para esporos que aderem fracamente na parte externa da semente; 2) o teste de viabilidade de esporos é necessário; e 3) a sensibilidade do teste deixa a desejar.

- d) Exame depois de lavagem e sedimentação: método usado somente para sementes de trevo, leucena e cebola, para detectar *Ditylenchus dipsaci*. As principais limitações do teste são a baixa sensibilidade e a mão de obra.
- e) Método de contagem de embrião: usado, principalmente, para o carvão voador da cevada e do trigo. Uma das limitações deste teste é que a presença do fungo no embrião nem sempre resulta em infecção nas plântulas. Cultivares resistentes podem apresentar este tipo de reação. Além disso, poucos patógenos podem ser detectados por este método.

3.4.2 Métodos com incubação

Estes testes empregam a incubação das sementes sob condições controladas, para permitir o crescimento e a esporulação dos fungos, permitindo a sua identificação, ao nível de espécie.

- a) Método do papel de filtro (teste de blotter): este método apresenta uma série de vantagens e algumas desvantagens. Dentre as vantagens destacam-se: 1) a combinação dos princípios **in vivo** e **in vitro** que, segundo Neergaard (1979), é uma das maravilhas do teste, uma vez que ele permite "a observação dos fungos que se desenvolvem no hospedeiro **in situ**, sem perturbação, numa condição natural de crescimento"; 2) basicamente, o método do papel de filtro é uma combinação da câmara úmida, da fitopatologia, com o teste de germinação, da tecnologia de sementes; e 3) o teste pode ser empregado para todos os tipos de sementes. Como desvantagens, este método apresenta: 1) fungos de crescimento rápido podem encobrir os de desenvolvimento mais lento; 2) o teste não detecta patógenos importantes como *Peronospora manshurica*, *Plasmopara halstedii* e outros parasitas obrigatórios; e 3) a contaminação com saprófitas (*Rhizopus* spp., *Mucor* sp., *Trichoderma* spp., *Cladosporium* spp., entre outros) pode dificultar a análise. Nessas amostras, a desinfestação superficial das sementes com solução de hipoclorito de sódio a 1,05% (Q-bou à 20%) facilita a leitura.

O método do papel de filtro pode ser empregado com algumas variações como: a) adição de 2,4-D (0,1% a 0,2%) na água utilizada para umedecer o papel, visando inibir a germinação das sementes de dicotiledôneas para facilitar a leitura; e, b) o congelamento rápido, introduzido por Limonard, em 1966, apresenta vantagens para sementes de forrageiras e cereais, facilitando a leitura e favorecendo o desenvolvimento de certos fungos [*Fusarium*, *Drechslera* (*Helminthosporium*), *Septoria* e *Phoma*, entre outros]. Porém, para a soja, o congelamento rápido é inadequado pois torna a leitura difícil devido à intensa proliferação de bactérias saprófitas. Mais detalhes sobre o método do papel de filtro serão fornecidos no item 5, que trata do teste de sanidade para sementes de soja.

b) Método da placa com agar: neste teste, as sementes são desinfestadas superficialmente numa solução de hipoclorito de sódio à 1,05%, por período de tempo que pode variar de um a 10 minutos, dependendo da cultura. Posteriormente, as sementes são colocadas em placas de Petri contendo meio de cultura. Existem diversos meios de cultura, porém os mais utilizados são o BDA (batata dextrose agar) com sua variação acídica (ABDA) e o extrato de malte agar (MEA). Outro meio de cultura muito utilizado para fungos de armazenamento (*Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.) é o extrato de malte sal (NaCl 18%) e água (MSA). Esses organismos, por serem halofílicos, crescem em meio salino que pode inibir o desenvolvimento dos outros fungos, facilitando assim a leitura.

Outras modificações do teste de agar são usadas, tornando os meios "seletivos" para determinados organismos. A adição de 2% de PCNB (penta cloro nitro benzeno) ao BDA é aconselhável para restringir o desenvolvimento do micélio de *Macrophomina phaseolina*, tornando, assim, mais fácil a sua quantificação. O método de Magano (Neergaard 1979) é utilizado para *Phoma betae*, em sementes de beterraba.

De modo geral, o método de agar é utilizado quando o teste em papel de filtro não oferece condições adequadas para o crescimento e a esporulação de determinados patógenos ou quando estes produzem colônias características no meio de cultura, sendo, deste modo, identificados macroscopicamente, sem a necessidade do preparo de lâminas.

Algumas desvantagens desses testes incluem os custos dos equipamentos e dos meios de cultura, além de serem mais trabalhosos e requererem laboratórios melhor equipados. Uma outra desvantagem é o fato de que os fungos de crescimento rápido encobrem os de desenvolvimento mais lento, tornando difícil a sua identificação, à semelhança do método do papel de filtro.

3.4.3 Métodos de sintoma em plântulas

Ao contrário dos métodos anteriores, que utilizam meios de cultura artificiais, estes testes empregam a semeadura das sementes em solo, areia ou outros substratos semelhantes, previamente autoclavados. A finalidade principal é dar condições para que as plântulas desenvolvam sintomas semelhantes aos encontrados em condições de campo. Em muitos casos, esses testes são mais adequados para simularem o desempenho de determinados lotes de semente a campo. Alguns dos métodos mais utilizados são dados a seguir.

- a) Teste de Hiltner: (método do tijolo moído), que é empregado para alguns cereais como o trigo, a cevada e a aveia. As partículas devem ter tamanho médio de 3 a 4 mm para oferecerem boa capilaridade e retenção de umidade. Após o umedecimento, coloca-se uma camada de mais ou menos 8 cm em uma bandeja, onde são semeadas 100 sementes distribuídas equidistantemente e cobertas por outra camada de 3 cm de espessura. Após o período de incubação de duas semanas em temperatura ambiente e sem iluminação, faz-se a avaliação das plântulas. O teste permite que as plântulas menos vigorosas sejam infectadas por

patógenos transmitidos pela semente, como o *Fusarium nivale* por exemplo, simulando, assim, as condições de campo.

- b) Teste de emergência em areia: método muito utilizado na Alemanha para cereais, hortalças e sementes de essências florestais. No Brasil, o método foi recomendado pelo LANARV (Laboratório Nacional de Referência Vegetal) para lotes de sementes de soja que apresentem altos índices de *Phomopsis* spp. (mais detalhes no item 5).

Além desses, outros testes, utilizando misturas de solos padronizadas e esterilizadas, são empregados para detectar *Drechslera* (*Helminthosporium*), *Fusarium* e *Septoria* em sementes de cereais.

As principais desvantagens desses métodos são o período prolongado de incubação, a mão de obra e o fato de não detectarem os patógenos de final de ciclo. Neste último caso, são necessários os testes que vão além do estágio de plântula. Porém, por serem onerosos e demorados, tais testes não são empregados em análises de rotina.

3.4.4. Testes bioquímicos:

A utilização do inóculo presente nas sementes para a inoculação em plantas indicadoras auxilia a identificação de bactérias e vírus. Existem metodologias refinadas para *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* (em feijão) e *Erwinia stewartii* (em milho). No caso de viroses, apesar do grande número de plantas indicadoras já conhecidas, o teste é pouco usado em análises de rotina, principalmente pela dificuldade na obtenção de plantas indicadoras (Lucca Filho 1987).

Outro teste também empregado para a detecção de algumas bactérias importantes é o método da placa de lise por bacteriófagos. Apesar de muito utilizado na pesquisa, devido a sua eficiên-

cia e alto grau de sensibilidade, este método é pouco usado em análises de rotina. Uma das principais razões é a falta de disponibilidade de bacteriófagos específicos para as bactérias importantes que precisam ser identificadas.

3.4.5 Testes sorológicos

As técnicas de sorologia, que são comumente utilizadas em medicina e veterinária, têm sido recentemente empregadas na fitopatologia para detectar e identificar patógenos, especialmente vírus e bactérias fitopatogênicas. Há pouco mais de uma década, a maior parte dos testes para esses patógenos requeriam o uso de plantas indicadoras ou os testes "grow out" que, além de demorados, demandavam muita mão-de-obra. Atualmente, os testes sorológicos abriram novas perspectivas no campo da fitopatologia para a identificação de fungos, vírus e bactérias. As principais vantagens desses testes são rapidez, alta sensibilidade e especificidade. Porém, as desvantagens incluem altos custos, equipamentos sofisticados, qualidade do antisoro e, principalmente, a impossibilidade da distinção entre inóculo viável e inviável. Os principais testes utilizados são discutidos sucintamente a seguir.

- a) Aglutinação: em cada extremidade de uma lâmina de microscópio são colocadas uma gota do extrato (antígeno) da semente a ser avaliada e uma gota do extrato de semente reconhecidamente livre do patógeno (testemunha). A seguir, sobre cada uma delas, é adicionada uma gota do antisoro, observando a reação. A presença do antígeno promove a aglutinação, indicando reação positiva. O método é eficaz para viroses em alta concentração nos tecidos, como o TMV (vírus do mosaico do tabaco).
- b) Esferas de látex sensibilizadas com gama-globulina: neste método, minúsculas esferas de látex são sensibilizadas com globulina do antisoro, para facilitar a visualização do precipitado (floculado) formado pela reação positiva entre o antígeno (extrato) e o antisoro. Segundo Lucca Filho (1987), esta técnica tem sido

usada para a detecção do vírus do mosaico comum da soja (VMCS), utilizando plúmulas e cotilédones de plântulas.

- c) Microprecipitação: método utilizado para testar tanto plântulas quanto sementes. O extrato (antígeno) é obtido de semente ou folha. Em tubo capilar de 1,3 a 1,5 mm de diâmetro por 100 mm de comprimento, são introduzidos o antisoro (aproximadamente 13 mm) e, posteriormente, o antígeno, na mesma quantidade. A mistura dos dois se dá por agitação circular do tubo e a formação de coágulos (microprecipitação) é observada sob microscópio estereoscópico, empregando uma fonte de luz incidente nos tubos.
- d) Difusão em ágar: o método pode ser vertical (em tubo de ensaio) ou horizontal (em placa de Petri). Em ambos os casos, a difusão pode ser simples ou dupla, dependendo da maneira com que o antisoro é introduzido.
 - d.1) Difusão simples: o antígeno é misturado ao ágar e o antisoro (extrato) é adicionado aos tubos (vertical) ou em seis orifícios, na placa de Petri, contendo ágar + antisoro (horizontal). No caso da difusão horizontal, a vantagem reside no fato de se poder colocar diferentes diluições do antisoro, em três orifícios e mais as testemunhas (extrato de planta ou semente sadia). A reação positiva é caracterizada pela formação de bandas branco-opacas, horizontais, no tubo-de-ensaio e, em forma de arco, na placa de Petri.
 - d.2) Difusão dupla: pode ser utilizado extrato de folha de plântula ou da semente. No método vertical (tubo de ensaio), o antígeno é separado do antisoro por uma camada de ágar solidificado. No método horizontal, também conhecido por Ouchterlony Test, em placa de Petri contendo agar previamente solidificado (1% agar, 0,85% de cloreto de sódio e 0,02% de azida de sódio), são feitos seis orifícios em torno de um orifício central onde é colocado o antisoro. Nos outros orifícios, são colocados, alternadamente, o extrato do mate-

rial (antígeno), em três diluições e o extrato do material sadio (testemunha). Após a incubação, em temperatura ambiente por um ou dois dias, é feita a avaliação. A reação positiva se caracteriza pela formação de uma zona de precipitação, arco branco-opaco.

- e) Imunofluorescência: o anticorpo específico é conjugado com um corante fluorescente. O extrato de semente (antígeno) é colocado em placas especiais com alvéolos pequenos. Posteriormente, é adicionado o anticorpo conjugado com o corante. Após a secagem, observar ao microscópio. Uma modificação deste método é a imuno-adsorvente imunofluorescência. Nesse caso, as placas especiais são "codificadas" com o anticorpo (gama-globulina). Após a adição do extrato da semente, somente o patógeno (antígeno) permanece aderido. Posteriormente, adicionar novamente o anticorpo, desta vez conjugado com o corante fluorescente, o qual adere às partículas do patógeno, produzindo fluorescência.
- f) ELISA - "enzyme linked immunosorbent assay": o método apresenta grande sensibilidade para a identificação de patógenos. Para este teste, são utilizadas placas especiais com alvéolos pequenos, os quais são sensibilizados pelo antisoro específico. As placas, após incubação a 37°C por aproximadamente quatro horas, são enxaguadas com água destilada e os alvéolos preenchidos com o antígeno e incubadas por 16 horas, a 6°C. Novamente as placas são enxaguadas e as partículas do antisoro (extrato) conjugadas à enzima são retidas pelo antígeno, fixado às paredes dos alvéolos. Posteriormente, é adicionado o substrato enzimático acrescido de um buffer. O substrato será hidrolizado pela enzima originando uma coloração amarelada que indica a reação positiva entre o antígeno e o antisoro. A sensibilidade do método permite detectar uma semente infectada em uma população de 1.000 sementes sadias.

g) Radio-imuno-assay: este processo vem sendo utilizado na Universidade Estadual de Iowa, para a quantificação do vírus do mosaico comum da soja (VMCS). Minúsculas esferas são sensibilizadas com o anticorpo específico que irá reter as partículas do vírus presentes no extrato da semente. A seguir, adicionar novamente o anticorpo, desta feita conjugado com um material radioativo, o qual se fixará às partículas de vírus. A medição da intensidade de radioatividade permite a quantificação do vírus.

Maiores detalhes sobre testes sorológicos poderão ser obtidos na recente publicação de Almeida (1995).

3.4.6 Microscopia eletrônica

Algumas técnicas são hoje utilizadas em microscopia eletrônica. A mais simples consiste na preparação direta, "negative staining", onde metais pesados são utilizados para produzir uma imagem negativa das partículas de vírus, formando zonas escuras ao redor das mesmas. As vantagens do método se resumem na possibilidade de medição do tamanho das partículas e na estimativa da concentração do vírus. Além deste método, pode-se empregar o ISEM - "Immunosorbent Electron Microscopy" ou o SSEM - "Serological Specific Electron Microscopy", onde antisoros são utilizados para sensibilizar os "grids" (telas), possibilitando a detecção de uma semente infectada em um lote de 1.000 sementes sadias.

4. FATORES DE VARIAÇÃO NOS TESTES DE INCUBAÇÃO

Diversos são os fatores que podem ocasionar variações nos resultados dos testes de sanidade. Dentre os principais destacaremos alguns.

a) Amostragem: a amostra deve ser coletada adequadamente, de acordo com os procedimentos prescritos pelas Regras de Aná-

lise de Sementes. A amostra deve ser representativa do lote de sementes, contendo todos os materiais e nas mesmas proporções encontradas no lote.

- b) Condições de armazenamento das amostras: o controle da temperatura e da umidade relativa do ar é indispensável para preservar a viabilidade da semente e dos patógenos. A duração e as condições de armazenagem podem levar a resultados completamente diferentes entre laboratórios, devido à perda da viabilidade dos patógenos de campo ou à proliferação de fungos de armazenagem (*Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp.).
- c) Pré-tratamento: quando utilizado, o pré-tratamento da amostra deve eliminar somente os fungos saprófitas e não erradicar patógenos importantes. A concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de exposição são fatores importantes a serem considerados.
- d) Número de sementes testadas: normalmente, o número de sementes necessárias para os testes de sanidade é estabelecido pelas Regras de Análise de Sementes. Esse número pode variar, dependendo da sensibilidade do teste e da importância do patógeno, do ponto de vista epidemiológico. Por exemplo, para o vírus do mosaico da alface (LMV), são testadas 30.000 sementes. O nível de tolerância, neste caso, é de 0,003%. Para algumas brássicas, este número cai para 1.000 sementes. Porém, para a maioria das grandes culturas normalmente testam-se 400 sementes por amostra, de acordo com as regras.
- e) Espaçamento das sementes no gerbox ou na placa de Petri: fator importante para evitar a contaminação de sementes sadias pelo inóculo proveniente de sementes infectadas. O espaçamento dependerá do tamanho da semente e da taxa de desenvolvimento do patógeno em relação ao período de incubação.
- f) Meio de cultura: para o teste de blotter (papel de filtro) este fator tem pouca importância. Porém para os métodos que utilizam

meios de cultura (BDA, MEA, etc.) a escolha do meio apropriado é fator primordial para a uniformização dos resultados.

- g) Temperatura: é fator importante para o crescimento e a reprodução dos organismos. As temperaturas ótimas, mínimas e máximas para o crescimento e a reprodução (esporulação) variam de acordo com o patógeno. A temperatura ótima para o crescimento do micélio pode ser diferente daquela para a esporulação do mesmo patógeno.
- h) Conteúdo de umidade: a quantidade de água deve ser adequada para propiciar a germinação e o desenvolvimento dos patógenos, durante o transcorrer do teste. No teste de blotter (papel de filtro), a quantidade de água é regulada pelo número de folhas de papel de filtro. O excesso de água favorece o desenvolvimento de *Alternaria* spp. e bactérias, que podem exercer efeitos antagonísticos sobre outros fungos. A falta de umidade poderá impedir a germinação das sementes ou o desenvolvimento dos microrganismos, afetando drasticamente os resultados do teste.
- i) Umidade relativa (UR %): tem pouca importância nos testes normais de incubação, exceto nos testes de sintoma em plântulas.
- j) Luz: a qualidade e os ciclos de escuridão/luz são importantes para a esporulação de muitos patógenos. A luz próxima do ultravioleta (NUV), com comprimento de onda de 365 nm, é desejável para a esporulação de alguns patógenos (*Alternaria* spp., em sementes de girassol). Porém, na maioria dos casos, a quantidade de raios ultravioleta presentes na luz branca fluorescente é suficiente para estimular a esporulação da maioria dos patógenos nas sementes.
- l) Período de incubação: basicamente, depende da velocidade de crescimento do patógeno, que é influenciada pela temperatura. O período de incubação deve ser adequado para permitir o grau máximo de infecção pelo patógeno.

- m) Condições de leitura na placa ou no gerbox: de acordo com a ISTA, uma das maiores fontes de variação nos resultados dos testes de sanidade é o erro humano, devido a fontes de luz deficientes ou microscópios estereoscópicos inadequados. As duas fontes de luz (de preferência fria) devem ser colocadas a uma distância que permita boa iluminação das placas sem aquecer e desidratar as colônias dos fungos. Os microscópios estereoscópicos devem possuir aumentos de 6, 12, 25 e 50 vezes.
- n) Habilidade e experiência do analista: em testes de rotina, envolvendo a análise de grande número de amostras, é importante que o analista possua habilidade para reconhecer e identificar os patógenos, mesmo em estádios iniciais de desenvolvimento. Analistas com pouca experiência frequentemente confundem patógenos importantes com saprófitas (exemplo: *Colletotrichum truncatum* com *Chaetomium* sp., em sementes de soja).

5. TESTE DE SANIDADE PARA SEMENTES DE SOJA

5.1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é afetada no campo por um grande número de doenças fúngicas e algumas bacterianas, além de viroses e nematóides. Dentre estas, as doenças causadas por fungos são consideradas muito importantes, não somente devido ao maior número, mas pelos prejuízos causados, tanto no rendimento quanto na qualidade da semente. Além disso, muitos desses microrganismos têm, na semente, o seu principal veículo de disseminação e de introdução em novas áreas de cultivo, onde, sob condições favoráveis de ambiente, poderão causar sérios danos à cultura.

No Brasil, com a expansão da cultura para as regiões Central e Norte, os problemas para a produção de sementes de alta qualidade têm aumentado. A ocorrência de condições climáticas desfavoráveis como chuvas e altas temperaturas durante as fases de maturação e colheita afeta, além da qualidade fisiológica, a sanidade das sementes (França Neto & Henning 1984).

Até o presente, foram identificados vários microrganismos em sementes de soja, porém, poucos são os que merecem destaque por serem economicamente importantes (Tabela 1). A relação a seguir é dos comumente encontrados porém, além desses, outros fungos podem, ocasionalmente aparecer na semente (Sinclair 1982), todavia não existe evidência suficientemente documentada de que os mesmos são comuns ou que causem doenças nesta leguminosa.

TABELA 1. Principais patógenos (ou saprófitas) comumente associados com sementes de soja.

Fungos

Alternaria spp.¹
Aspergillus spp.²
Botryodiplodia sp.³
Botrytis sp.¹
Cephalosporium spp.¹
*Cercospora sojina*³
*Cercospora kikuchii*³
Chaetomium sp.¹
Cladosporium sp.¹
Colletotrichum sp.¹
C. dematium var. *truncata*³
Corynespora spp.¹
*C. cassicola*³
Curvularia spp.¹
Diaporthe phaseolorum var. *caulivora*⁴
Diaporthe phaseolorum f.sp. *meridionalis*⁴
Diaporthe phaseolorum var. *sojae*⁴
Drechslera spp. (*Helminthosporium* spp.)¹

Continua...

TABELA 1. Continuação.

Epicoccum sp.¹
Fusarium spp.³
Gliocadium sp.¹
*Glomerella glycines*³
*Macrophomina phaseolina*³
Monilia sp.¹
Mucor sp.¹
*Myrothecium roridum*³
*Nematospora coryli*³
Penicillium sp.¹
Periconia sp.¹
*Peronospora manshurica*³ (crosta de oosporos)
*Phialophora gregata*⁴
Phomopsis spp.³
Phoma sp.¹
Phyllosticta sp.⁴
*Phytophthora megasperma*⁴
Pithomyces sp.¹
*Rhizoctonia solani*³
Rhizopus spp.¹
Septoria glycines^{3,4}
*Sclerotinia sclerotiorum*³
*Sclerotium rolfsii*³
Stemphylium spp.¹
Trichoderma spp.¹
Trichothecium sp.¹
Ulocladium sp.¹
Verticillium sp.¹

Bactérias

*Bacillus subtilis*⁴
Curtobacterium flaccumfaciens p.v. *flaccumfaciens* (*Corynebacterium flaccumfaciens*)⁴
*Pseudomonas solanacearum*⁴
Pseudomonas syringae pv. *glycinea*³
Xanthomonas campestris pv. *glycines*³

Continua...

TABELA 1.Continuação.

Vírus

Vírus do mosaico comum da soja (VMCS)³

Vírus da necrose anelar do fumo (Tobacco Ringspot Vírus-TRV)

Vírus da necrose branca do fumo (Tobacco Streak Virus-TSV)

Nematóides

*Heterodera glycines*³ (contaminação em partículas de solo)⁴

¹ Contaminantes e/ou saprófitas

² *Aspergillus*: importante fungo de armazenagem

³ Patógenos comumente causadores de doença em soja

⁴ Relatos no exterior (Richardson, 1979 e 1981)

5.2 PATÓGENOS IMPORTANTES NAS SEMENTES E DOENÇAS NA CULTURA

5.2.1 *Phomopsis* spp. - Seca da haste e da vagem

Esta doença ocorre naturalmente na maioria das lavouras de soja, sem causar sérios prejuízos ao rendimento. Porém, pode reduzir a qualidade das sementes, especialmente quando ocorrem períodos chuvosos associados com altas temperaturas durante a fase de maturação (Fig. 1). Os sintomas da doença na planta aparecem durante a fase final do ciclo, sendo caracterizados por pontuações pretas (picnídios), que são formados linearmente na haste e pecíolos e, ao acaso, sobre as vagens. As sementes infectadas, após o período de incubação, apresentam normalmente o micélio branco, compacto, sob o qual aparecem os picnídios. Não raramente, *Phomopsis* sp. apresenta apenas picnídios sobre a semente. Nesses casos, a identificação segura deve ser feita com o auxílio de microscópio biológico, usando aumentos de até 400 vezes, para observar a presença dos esporos alfa e beta. Muitas

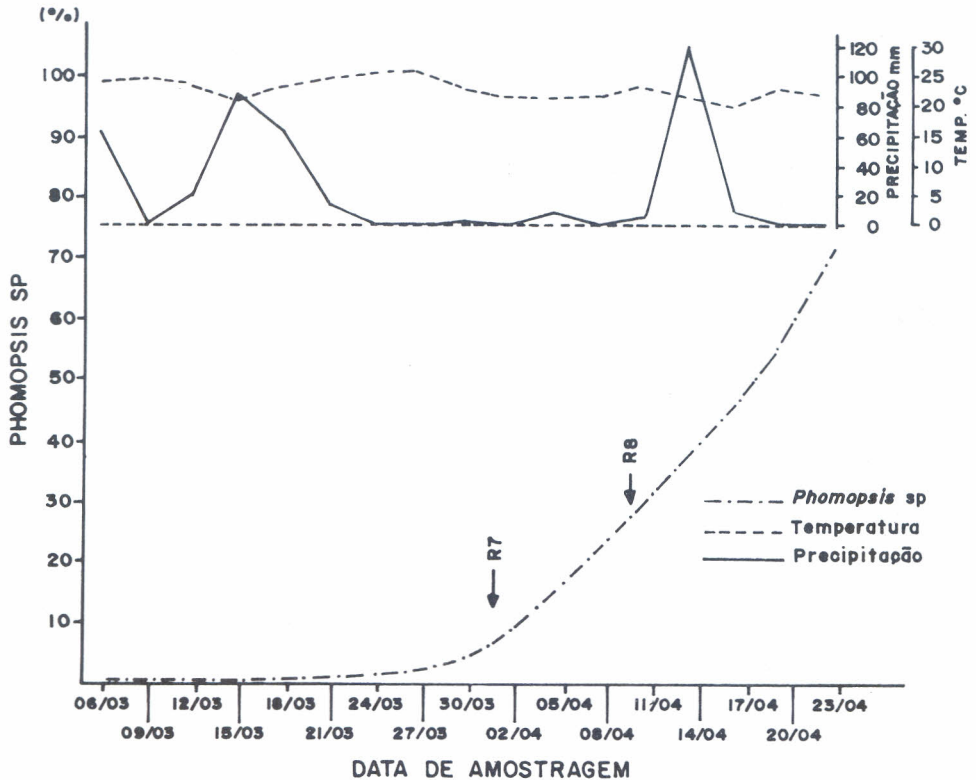


Fig. 1. Evolução da incidência de *Phomopsis* sp. em sementes de soja 'Bossier', associada às condições climáticas na safra 1979/80 em Londrina, PR. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1994. Modificado de França Neto *et al.* 1984a.

vezes, ambos os tipos de esporos são produzidos no mesmo picnídio (característica da espécie), porém, algumas vezes, são produzidos apenas esporos alfa ou beta num picnídio. O fungo torna o teste padrão de germinação (rolo de papel, 25°C) inviável em lotes de sementes com altos índices de infecção. Todavia, o mesmo não afeta a germinação em areia ou a emergência de plântulas no solo. Por essa razão, deve-se, em tais circunstâncias, substituir o teste

padrão de germinação pelo de germinação em areia ou pelo teste de tetrazólio que, em conjunto com o teste de sanidade, fornece um diagnóstico completo da qualidade da semente (Henning & França Neto 1984).

Durante a armazenagem, em condição ambiente, *Phomopsis* sp. perde viabilidade rapidamente, ocorrendo, ao mesmo tempo, um aumento gradual na percentagem de germinação em laboratório (Fig. 2). Esse "aumento" na germinação depende também da qualidade fisiológica da semente. Danos mecânicos, deterioração por umidade e danos por percevejo são, freqüentemente, responsáveis pela baixa qualidade da semente e, não raramente, estão associados com *Phomopsis* sp. Nesses casos, mesmo que o fungo tenha perdido sua viabilidade durante a armazenagem, a germinação poderá não alcançar o padrão mínimo necessário para sua comercialização (Fig. 3), razão pela qual o tratamento da

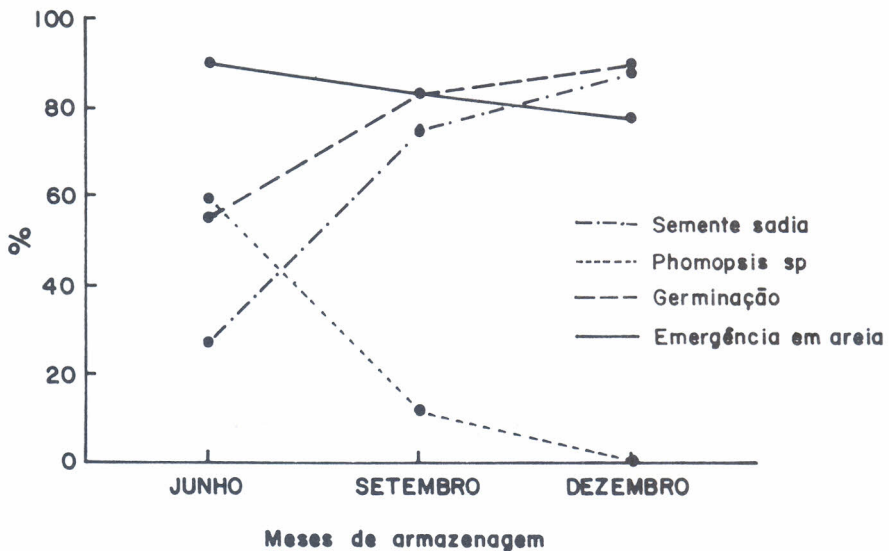


Fig. 2. Efeito do período de armazenamento sobre as qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja 'Paraná'. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1981.

semente com fungicida, antes ou durante o período de armazenagem, não é recomendado. O tratamento deve ser realizado imediatamente antes da semeadura, quando esta for efetuada: 1) em solo seco; 2) em solo com umidade excessiva e/ou baixas temperaturas; 3) quando da utilização de semente de vigor inferior (padrão B); ou 4) com a finalidade de controlar patógenos específicos (Henning et al. 1984, 1994).

Ressalta-se a ocorrência de isolados de *Phomopsis* sp. que diferem em patogenicidade quando inoculados artificialmente em sementes de soja. Aparentemente, a ocorrência de isolados mais patogênicos é insignificante, sob nossas condições, já que não têm sido observados problemas de emergência em lotes de sementes com alta percentagem de *Phomopsis* sp.

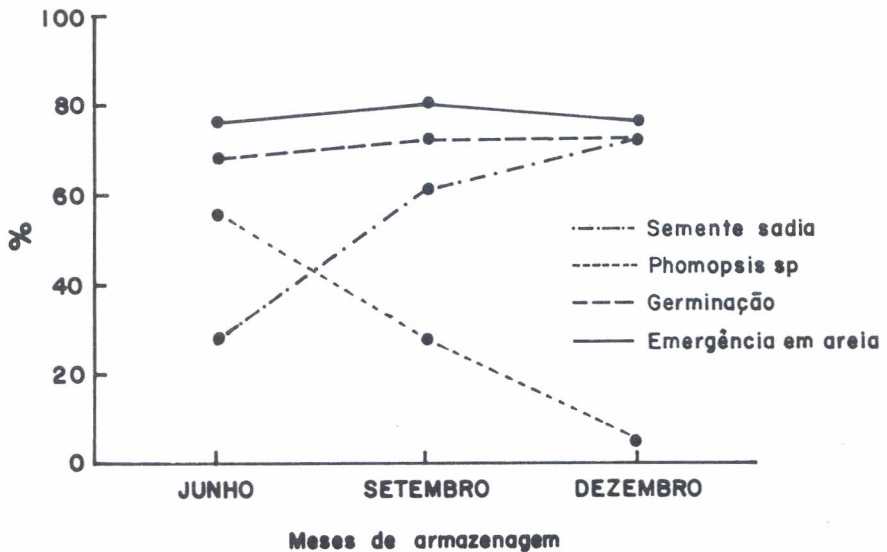


Fig. 3. Efeito do período de armazenamento sobre as qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja 'Bossier'. EMBRAPA-CNPSo. Londrina, PR. 1981.

5.2.2 *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (*Phomopsis meridionalis*) Morgan-Jones - Cancro da haste

O cancro da haste foi constatado pela primeira vez na safra 1988/1989 no Sul do Paraná e em uma pequena área em Mato Grosso (Yorinori et al. 1989, Yorinori 1990). Sua disseminação foi muito rápida, sendo encontrado na safra seguinte, em todas as regiões produtoras de soja do País. Na safra 1991/1992, milhares de hectares de soja dos estados do Paraná, de Santa Catarina e, inclusive, do Paraguai, foram dizimados pelo cancro da haste.

A taxa de transmissão do fungo pela semente é muito baixa (< 1 %) porém, se as sementes não forem tratadas com fungicidas adequados (Tabela 2), o fungo pode ser introduzido em áreas inde- nes. As poucas plantas infectadas no primeiro ano multiplicarão o inóculo podendo resultar em grandes perdas na safra seguinte, se as condições climáticas forem favoráveis, ou seja, período chuvoso nos primeiros 30 a 40 dias após a emergência das plântulas.

5.2.3 *Colletotricum dematium* (Pers. ex. fr.) Grove var. *truncata* (Schw.) Von Arx. - Antracnose

A antracnose, causada por *C. dematium* var. *truncata* (*C. truncatum*), é responsável por sérios prejuízos às lavouras de soja, especialmente na região dos cerrados.

Os sintomas desta doença podem ser observados visualmente desde as fases iniciais da planta, ocasionando lesões nos cotilédones, na haste e nos ramos, os quais, após secar, ficam tomados por pontuações escuras, os acérvulos, onde são observadas inúmeras setas escuras, que é também a característica utilizada para a identificação do patógeno nas sementes, após o período de incubação.

O fungo pode causar deterioração da semente, morte de plântulas (Tiffany 1951) e infecção sistêmica em plantas adultas (Neergaard 1979). Devido à sua baixa ocorrência em sementes, até

TABELA 2. Fungicidas e respectivas doses, para o tratamento de sementes de soja. XIX Reunião de Pesquisa de Soja das Regiões Central e Sul do Brasil.1997

Nome comum ♦ Produto comercial¹	Dose/100 Kg de semente Ingrediente ativo (gramas) ♦ Produto comercial (g ou ml)
Benomyl + Captan ³ ♦ Benlate 500 + Captan 750 TS	30 g + 90 g ♦ 60 g + 120 g
Benomyl + Thiram ³ ♦ Benlate 500 + Rhodiauran 500 SC	30 g + 70 g ♦ 60 g + 140 ml
Benomyl + Tolyfluanid ³ ♦ Benlate 500 + Euparen M 500 PM	30 g + 50 g ♦ 60 g + 100 g
Carbendazin + Captan ³ ♦ Derosal 500 SC + Captan 750 TS	30 g + 90 g ♦ 60 ml + 120 g
Carbendazin + Thiram ³ ♦ Derosal 500 SC + Rhodiauran 500 SC	30 g + 70 g ♦ 60 ml + 140 ml
Carbendazin + Tolyfluanid ³ ♦ Derosal 500 SC + Euparen M 500 PM	30 g + 50 g ♦ 60 ml + 100 g
Carboxin + Thiram ♦ Vitavax + Thiram PM ♦ Vitavax + Thiram 200 SC ²	75 g + 75 g ou 50 + 50 g ♦ 200 g ♦ 250 ml
Difenoconazole + Thiram ³ ♦ Spectro + Rhodiauran 500 SC	5 g + 70 g ♦ 33 ml + 140 ml
Thiabendazole + Captan ³ ♦ Tecto 100 (PM e SC) + Captan 750 TS	15 g + 90 g ♦ 150 g ou 31 ml + 120 g
Thiabendazole + PCNB ^{3,4}	15 g + 112,5 g
Thiabendazole + Thiram ³ ♦ Tecto 100 (PM e SC) + Rhodiauran 500 SC	17 g + 70 g ♦ 170 g ou 35 ml + 140 ml
Thiabendazole + Tolyfluanid ³ ♦ Tecto 100 (PM e SC) + Euparen M 500 PM	15 g + 50 g ♦ 150 g ou 31 ml + 100 g

¹ Poderão ser utilizadas outras marcas comerciais, desde que sejam mantidos a dose do ingrediente ativo e o tipo de formulação; ² Fazer o tratamento com pré-diluição, na proporção de 250 ml do produto + 250 ml de água para 100 kg de semente; ³ Mistura não formulada comercialmente; ⁴ Na Região Sul (RS e SC) foram mantidos os nomes dos produtos comerciais (Tecto 100 + Plantacol).

Cuidados: devem ser tomadas precauções na manipulação dos fungicidas, seguindo as orientações da bula dos produtos.

recentemente pouco se sabia das implicações que um lote com alta incidência de *C. truncatum* poderia trazer se fosse aprovado em teste de germinação com tratamento da amostra de sementes.

Com a expansão da cultura para a região do Brasil Central, em algumas safras, tem sido observado um aumento considerável na ocorrência de *C. truncatum* em sementes de soja. França Neto et al. (1984b) relataram percentagens de infecção superiores a 50%. Índice elevado de infecção de sementes como este só havia sido relatado na Índia (Agarwal 1981).

Recentemente, Henning & Matsuo (1993) demonstraram que *C. truncatum* é mais persistente que *Phomopsis* spp. e *Fusarium semitectum* nas sementes de soja armazenadas por vários meses. Sementes da cultivar Cariri (BR-27) com índice de 64,2% de infecção, após seis meses de armazenamento, apresentaram 33,7% quando a 18° C, 29,2% quando a 10°C, em câmara seca, e 17,8% quando em temperatura ambiente. O armazenamento, em condição ambiente, reduziu acentuadamente (64,2% para 17,8%) o índice de sementes infectadas; porém, ao contrário de *Phomopsis* sp. e *Fusarium semitectum*, o fungo não perdeu completamente a viabilidade. Por essa razão, o tratamento de sementes com fungicidas adequados (Tabela 2) é recomendado em lotes que apresentem ao redor de 5% de sementes infectadas.

5.2.4 *Cercospora kikuchii* (Matsu & Tomoy) Gardner - Mancha-púrpura

Embora o sintoma característico causado por *C. kikuchii* na semente seja a mancha-púrpura, nem todas as sementes infectadas apresentam esta coloração do tegumento. O fungo pode também afetar as vagens, as hastes e os pecíolos, causando manchas castanho-avermelhadas, e as folhas, causando crestamento foliar (Walters 1980). A fase de crestamento foliar, que provoca a desfolha prematura e ocorre simultaneamente com *Septoria glycines*, pode causar redução da produtividade pela diminuição do peso das

sementes (Walters 1984, Yorinori 1983). Quando a infecção nas sementes ocorrer na fase de enchimento das vagens, poderá ocorrer necrose nos cotilédones, afetando a germinação (Walters 1984). Por outro lado, Henning et al. (1981) não observaram efeito negativo do fungo sobre a qualidade da semente, em ensaios conduzidos no Estado do Paraná. Sementes das cultivares Paraná, Davis e Bossier, com 0%, 5%, 10%, 20% e 40% de mancha-púrpura não diferiram entre si com relação à germinação em rolo de papel a 25°C, emergência a campo e rendimento. O maior índice de infecção por *C. kikuchii* observado na semente colhida foi de 2,12%, indicando que, nas condições em que o estudo foi realizado, a taxa de transmissão semente-planta-semente foi baixa.

No teste de sanidade, a presença da coloração púrpura no tegumento facilita, sobremaneira, a identificação do fungo, bastando observar o crescimento do mesmo e/ou a esporulação. Os conídios longos, hialinos e septados são produzidos em fascículos e distinguem-se dos conidióforos que são de cor marrom-escura. O tratamento das sementes com fungicidas (Tabela 2) pode ser adotado como medida preventiva da disseminação do patógeno para novas áreas, onde, sob condições adequadas de temperatura e umidade, poderá causar severos danos à soja e permanecer viável nos restos de cultura.

5.2.5 *Cercospora sojina* Hara - Mancha "olho-de-rã"

Nas folhas, o sintoma mais característico da doença é a presença de lesões cinza claro com bordas castanho-avermelhadas, as quais aparecem próximo à fase de floração. O fungo pode afetar também hastes, vagens e sementes. Nas hastes, as lesões são alongadas, com bordas pardas, as quais são mais evidentes no final do ciclo. As sementes infectadas podem ter coloração cinza-esverdeada no tegumento que, freqüentemente, apresenta rachaduras. A utilização de cultivares resistentes à doença tornou esporádica a presença do patógeno em lotes comerciais de semente. Para

reduzir a possibilidade de transmissão e introdução do patógeno em novas áreas de cultivo, o tratamento da semente com a mistura de thiabendazol + thiram, thiabendazol + captan, thiabendazol + PCNB ou benomyl + thiram (Tabela 2) é recomendado.

No teste de sanidade, após o período de incubação, a presença dos fascículos com conidióforos escuros e conídios hialinos, septados, são as características utilizadas para diferenciar *C. kikuchii* de *C. sojina*, cujos esporos são bem menores.

5.2.6 *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid - Podridão preta das raízes

A doença ocorre com muita frequência e pode causar prejuízos, em condição de clima seco. O problema pode ser agravado em lavouras onde o preparo do solo não é adequado, permitindo a formação do "pé-de-grade" e, conseqüentemente, as plantas desenvolvem sistema radicular superficial, não suportando veranicos. A transmissão por semente, embora ocorra, não é importante, uma vez que o inóculo existe na maioria dos solos.

No campo, as plantas atacadas, apresentam deterioração do sistema radicular, com formação intensa de microesclerócios sob a epiderme, os quais matam as plantas prematuramente pelo bloqueamento dos vasos vasculares. Na semente, após o período de incubação em gerbox, o fungo apresenta formação de micélio escuro com abundante produção de microesclerócios pretos sobre a semente e que podem espalhar-se sobre o papel de filtro. Esta característica permite a identificação do patógeno com segurança, mesmo a olho nu.

5.2.7 *Rhizoctonia solani* Kuhn - Tombamento e morte em reboleira

Este fungo pode causar doença tanto na fase de plântula (tombamento) quanto na fase adulta (morte em reboleira), durante o período de floração. Os sintomas, nas plântulas, são caracterizados

por lesões marrom-avermelhadas, na região do colo. Nas plantas adultas, as reboleiras começam a aparecer aproximadamente na fase de floração com o amarelecimento das folhas, clorose ao longo das nervuras, murchamento das folhas jovens e do broto apical. Finalmente, ocorre murcha e morte das plantas, que retêm os pecíolos voltados para baixo (Ferreira et al. 1979). O microrganismo é um habitante do solo, permanecendo viável em restos de cultura. Em algumas regiões do sul, em áreas novas de cultivo, têm sido relatadas severas perdas em lavouras, porém, de modo geral, após dois ou três anos de cultivo, a incidência da doença diminui tendendo a desaparecer na maioria dos casos. A taxa de transmissão do fungo por semente é baixa e sua importância é questionável, já que o mesmo ocorre naturalmente nos solos. A identificação do fungo no teste de sanidade de semente é feita com base na característica do micélio marrom, onde as hifas septadas possuem ramificação em ângulo de 90°. Não há produção de esporos.

5.2.8 *Sclerotinia sclerotiorum* Lib (De Bary) - Podridão branca da haste.

A doença pode causar severas perdas em anos chuvosos e com temperaturas amenas em algumas regiões do sul do Paraná e Minas Gerais. As plantas atacadas apresentam micélio branco, algodinoso, que se desenvolve sobre a haste e os ramos da soja, onde, posteriormente, são formados os esclerócios. Tais estruturas de resistência podem igualmente ser produzidas no interior da haste, adquirindo a forma cilíndrica. Durante a colheita, os esclerócios são espalhados no solo, onde podem permanecer viáveis por vários anos.

A transmissão por semente pode ocorrer tanto através de micélio dormente (interno) quanto esclerócios misturados à semente. A chance da transmissão do fungo através de esclerócios misturados à semente pode ser reduzida, ou praticamente eliminada, pelo beneficiamento da semente com o emprego do separa-

dor espiral seguido da mesa de gravidade. Quanto à transmissão por micélio dormente, ainda que a taxa seja muito baixa num lote de semente, a sua importância reside na possibilidade de introdução do inóculo em novas áreas de cultivo. O fungo, devido à formação de estruturas de resistência (esclerócios), é de difícil erradicação após introduzido numa área. O tratamento de sementes com os fungicidas thiabendazol ou thibendazol + thiram (Tabela 2) pode ser adotado como medida de segurança para reduzir tal risco.

No teste de sanidade de sementes, rotineiramente empregado (papel de filtro, a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 7 dias), dificilmente o fungo é detectado. Melhores resultados são obtidos quando a temperatura é reduzida para 15°C e o período de incubação aumentado para duas semanas. A identificação é feita com base na presença do micélio branco típico e na formação de esclerócios.

5.2.9 *Fusarium semitectum* Berk. & Rav.

Diversas espécies de *Fusarium* têm sido relatadas, porém, em nossas condições, *Fusarium semitectum* é a mais comum em sementes de soja. Este fungo, considerado por alguns autores como parasita fraco ou saprófita, foi propositadamente incluído entre os fungos fitopatogênicos, por causar problemas de germinação em laboratório, de maneira semelhante ao *Phomopsis* sp. O fungo está comumente associado às sementes que sofreram atraso de colheita ou deterioração por umidade no campo (Henning & França Neto 1980). *Fusarium semitectum*, apesar de isolado de cotilédones de plântulas anormais, oriundas de sementes naturalmente infectadas, não produziu sintomas de doença, quando inoculado em plantas de soja e girassol, em casa de vegetação.

O sintoma típico de *Fusarium semitectum* em sementes de soja, após o período de incubação, é a presença de micélio normalmente branco, porém variando do amarelo-pêssego até o marrom (dependendo da idade da cultura) e com aspecto algodono-oso e denso. Sob o microscópio estereoscópico (50 aumentos) é

possível observar as frutificações típicas do fungo, os conídios são produzidos livremente sobre as hifas.

Além desses patógenos, outros como *Myrothecium roridum* (mancha-de-mirotécio), *Corynespora cassiicola* (mancha-alvo e podridão radicular) e *Sclerotium rolfsii* (murcha-de-esclerócio), podem, eventualmente, ocorrer nas sementes.

5.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS PATÓGENOS NAS SEMENTES

O principal método utilizado na análise de sementes de soja é o do papel de filtro ("blotter"). A experiência tem comprovado que este método é perfeitamente viável, sendo o mais eficaz para a cultura. Em casos específicos, o método pode ser alterado, variando a temperatura e o período de incubação, para detectar patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para a execução do teste, as caixas plásticas (gerbox) podem ser utilizadas por muito tempo, bastando que as mesmas sejam lavadas com detergente, após cada uso, enxaguadas e secas. Antes de sua utilização, as mesmas devem ser desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1,05% (Q-bou a 20%).

O papel de filtro (80 g/m²) deve ser cortado em folhas de 10,5 cm x 10,5 cm, acondicionado em sacos de papel e esterilizado em estufa a 160°C, por 20 minutos. Após esse período, aguardar o resfriamento da estufa antes de abrí-la.

Para a montagem, colocar quatro folhas de papel de filtro em cada gerbox previamente esterilizado e adicionar água (autoclavada de preferência), suficiente para umedecer o papel, (evitar excessos que favorecem a ocorrência de bactérias e *Alternaria* spp.).

Posteriormente, tomar, aleatoriamente, 20 sementes que são dispostas no gerbox, na forma de 5 x 4. Montar 20 gerbox (total de quatrocentas sementes) por amostra. Após a montagem, o ma-

terial deve ser mantido em ambiente (câmara com ar condicionado, germinador etc.) a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por sete dias (Brasil 1992).

A avaliação é feita em cada semente, sendo anotada, em ficha apropriada (Fig. 4), a ocorrência dos diversos patógenos. *Aspergillus flavus* e *Penicillium* spp., apesar de considerados saprófitas por alguns autores, devem ser contados por serem fungos de armazenagem, responsáveis pela completa deterioração das sementes, em casos específicos (umidade e temperaturas elevadas).

Vale ressaltar que a luz não é fator limitante nos testes de sanidade da soja. Bons resultados são obtidos com luz branca fluorescente ou mesmo com luz natural. Todavia, laboratórios credenciados pelo Sistema LANARV do MAARA deverão seguir as Normas para Análise de Sementes (Brasil 1992) empregando ciclos alternados de 12 h de luz e 12 h de escuridão.

	CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - CNPSO Rodovia Carlos João Strass (Londrina/Warta) Acesso Orlando Amaral Cx. Postal, 231 - Fone: (043) 371-6000 - Fax: (043) 320-4186 - Telex: (432) 208 CEP 86.001-970 - LONDRINA, PR.										
	PATOLOGIA DE SEMENTES										
MÉTODO: <input type="checkbox"/> PAPEL DE FILTRO <input type="checkbox"/>		PERÍODO: INÍC. TÉRM.									
Nº SEM. TESTADAS		REGISTRO Nº.									
ESPÉCIE <input type="checkbox"/> SOJA VARIEDADE <input type="checkbox"/>		DATA DA COLHEITA, MÊS E ANO:									
LOCAL DA COLHEITA:		DATA DO RECEBIMENTO:									
CONDIÇÕES CLIMÁTICAS:		OBSERVAÇÕES NO CAMPO:									
REMETENTE/ENDEREÇO:											
OUTRAS INFORMAÇÕES (TRAT. DE SEM. E ETC.):											
DOENÇA/PATÓGENO	REPETIÇÕES										%
<i>Aspergillus flavus</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Aspergillus niger</i>											
<i>Aspergillus sp.</i>											
<i>Cercospora kikuchii</i>											
<i>Colletotrichum dematium</i>											
<i>Corynespora sp.</i>											
<i>Fusarium semitectum</i>											
<i>Phomopsis sp.</i>											
BACTÉRIA											
DANO MECÂNICO											
GERMINAÇÃO											
SAPRÓFITAS: <input type="checkbox"/> <i>Alternaria tenuis</i>	<input type="checkbox"/> <i>Curvularia sp.</i>										
<input type="checkbox"/> <i>Chaetomium sp.</i>	<input type="checkbox"/> <i>Rhizopus sp.</i>										
<input type="checkbox"/> <i>Cladosporium sp.</i>	<input type="checkbox"/> <i>Mucor sp.</i>										
	<input type="checkbox"/> <i>Trichoderma sp.</i>										
	<input type="checkbox"/> <i>Nigrospora sp.</i>										
	<input type="checkbox"/> BACTÉRIA										
	<input type="checkbox"/>										
	<input type="checkbox"/>										
	<input type="checkbox"/>										
OBSERVAÇÕES: ANALISTA										

Fig. 4. Modelo de ficha utilizado na análise sanitária de sementes no Laboratório de Patologia de Sementes da EMBRAPA-CNPSO. Londrina, PR.

BIBLIOGRAFIA

- AGARWAL, V.K. Seed-borne fungi and viruses of some importance crops. Pantnagar: Govind Ballabh Pant University of Agriculture and Technology, 1981. n.p. (Research Bulletin, 108).
- ALMEIDA, A.M.R. Noções de sorologia aplicadas à Fitovirologia. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1995. 105p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 87).
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. Regras para Análise de Sementes. Brasília, 1992. 365p.
- FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. Doenças da soja no Brasil. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979. 41p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 1).
- FERREIRA, L.P.; HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; SOHUK, E.; LEMOS, E.C.; AZEVEDO, J.A.D. Ocorrência do míldio (*Plasmopora halstedii*) em girassol no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 3., 1983, Campinas. Resumos... Brasília: ABRATES, 1983. p.93.
- FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; BARRETO, J.N. Efeito da aplicação de fungicidas foliares, sobre a maturação fisiológica de sementes de soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., 1984, Campinas. Resumos... Londrina: EMBRAPA-CNPSO. 1984a. p.136.
- FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P.; HENNING, A.A.; ZUFFO, N.L.; BARRETO, J.N.; PEREIRA, L.A.G. Efeito da época de semeadura sobre a qualidade da semente de soja no Mato Grosso do Sul. Campo Grande: EMPAER, 1984b. p.9. (EMPAER. Pesquisa em Andamento, 3).

- FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. 39p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 9).
- HENNING, A.A. Testes de sanidade de sementes de soja. In: SOAVE, J. & WETZEL M.M.N.S. eds. Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.441-454.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Problemas na avaliação de germinação de sementes de soja com alta incidência de *Phomopsis* sp. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.2, nº5, p.9-22, 1980.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Effect of *Phomopsis* spp. on soybean seed quality in Brazil. In: CONFERENCE ON THE DIAPORTHE / DIAPORTHE DISEASE COMPLEX OF SOYBEAN, 1984, Fort Walton Beach. Proceedings... Springfield, 1984. p.66-67.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. Avaliação dos efeitos de diferentes níveis de sementes com mancha-púrpura, sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa de soja 1980/81. Londrina, 1981. p.290-294.
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. Recomendações de fungicidas para o tratamento de sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1984. 4p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 31).
- HENNING, A.A.; FRANÇA NETO, J.B. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary and *Alternaria* spp., in sunflower seeds. In: INTERNATIONAL SUNFLOWER CONFERENCE, 11., 1985. Mar del Plata. Proceedings... Mar del Plata, 1985. p.475-478.

- HENNING, A.A.; MATSUDA, J.M. Efeito do ambiente e do período de armazenamento sobre a viabilidade de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja. Informativo ABRATES, v.3, n.3, p.101, 1993. (Resumo apresentado no VIII Congresso Brasileiro de Sementes).
- HENNING, A.A.; CATTELAN, A.J.; KRZYZANOWSKI, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; COSTA, N.P. Tratamento e inoculação de sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 6p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 54).
- HENNING, A.A.; MATSUDA, J.M. Efeito do ambiente e do período de armazenamento sobre a viabilidade de *Colletotrichum truncatum* em sementes de soja. Fitopatologia Brasileira, v.19, p.268. 1994. (Resumos dos trabalhos apresentados no XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia).
- HENNING, A.A. Controle químico de *Colletotrichum truncatum* e *Phomopsis* sp. em sementes de soja. Fitopatologia Brasileira, v.19, p.328, 1994. (Resumos dos trabalhos apresentados no XXVII Congresso Brasileiro de Fitopatologia).
- LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. *Neth. J. Pl. Path.*, v. 72:319-321, 1966
- LUCCA FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J. & WETZEL M.M.N.S. eds. *Patologia de Sementes*. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.276-298.
- NEEGAARD, P. Seed pathology. 2.ed. London: McMillan, 1979. 2v.
- RICHARDSON, M.J. An annotated list of seed-borne diseases. 3.ed. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1979. 320p.
- RICHARDSON, M.J. Supplement to an annotated list of seed-borne diseases. 3.ed. Zurich: International Seed Testing Association, 1981. 78p.

- SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. eds. Patologia de sementes. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 480 p.
- SINCLAIR, J.B. Compendium of soybean diseases. 2.ed. Minnesota, American Phytopathological Society, 1982. 104p.
- TIFFANY, L.M. Delayed sporulation of *Colletotrichum* on soybean. Phytopathology, Lancaster, v.41, p.975-85, 1951.
- WALTERS, H.J. Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. Plant Disease, St. Paul, v.64, p.961-962, 1980.
- WALTERS, H.J. Purple seed stain and *Cercospora* leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3., 1984, Iowa, Program and Abstract... Ames: Iowa State University, 1984. p.5.
- WETZEL, M.M.V.S.; BETTIOL, E.M.; FAIAD, M.G.R. Bibliografia Brasileira de Patologia de Sementes. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1981. 177p.
- WILCOX, J.R.; ABNEY, T.S. Effects of *Cercospora kikuchii* on soybeans. Phytopathology, St. Paul, v.63, p.796-797, 1973.
- YORINORI, J.T. Avaliação de danos causados por *Septoria glycines* em cultivares de soja. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa de soja 1982/83. Londrina, 1983. p.213-221.
- YORINORI, J.T. Tratamento de sementes de soja para controle da disseminação de *Cercospora sojina* Hara (mancha olho-de-rã). In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 3., 1984, Campinas. Resumos... Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1984. p.33.

YORINORI, J.T.; ALMEIDA, A.M.R.; HOMECHIN, M.; KIIHL, R.A.S.; POLA, J.N. Epifítia do cancro da haste da soja nos municípios de Castro, Palmeira, Ponta Grossa e Tibagi, no Paraná e Rondonópolis, no Mato Grosso, na safra 1988/89. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 5., 1989, Campo Grande. Resumos... Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1989. p.22-23.

YORINORI, J.T. **Cancro da haste da soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1990. 8p. (EMBRAPA-CNPSO. Comunicado Técnico, 44)



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Soja
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rod. Carlos João Strass (Londrina/Warta)
Caixa Postal 231 - CEP 86 001-970
Telefone: (043) 371 6000 - Fax (043) 371 6100
Londrina - Paraná



Euparen[®] M

O Protetor



- ✓ Novo fungicida para sementes.
- ✓ Ação protetora, combinada com amplo espectro.
- ✓ Maior estande de plantas.
- ✓ Compatível com o inoculante (*Bradyrhizobium japonicum*).
- ✓ Recomendado pelas comissões de pesquisa de soja.
- ✓ Viabiliza o potencial produtivo.

ATENÇÃO

Este produto é perigoso à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Leia atentamente e siga rigorosamente as instruções contidas no rótulo, na bula e na receita. Utilize sempre os equipamentos de proteção individual. Nunca permita a utilização do produto por menores de idade.

Consulte sempre um Engenheiro Agrônomo
Venda sob receituário agrônômico



Bayer



Proteção das Plantas